

Aus dem Institut für Virologie

**Hemmung
der durch die Paramyxoviren SV5 und NDV
induzierten Fusion von BHK21-F-Zellen durch
2-Desoxy-D-Glucose und D-Glucosamin.**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereiches Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von
Knut Bortfeldt
aus Hamburg

Gießen 1974

Aus dem Institut für Virologie

Hemmung
der durch die Paramyxoviren SV5 und NDV
induzierten Fusion von BHK21-F-Zellen durch
2-Desoxy-D-Glucose und D-Glucosamin.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereiches Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von
Knut Bortfeldt
aus Hamburg

Gießen 1974

Mit Genehmigung des Fachbereiches Humanmedizin in Gießen

Dekan: Prof. Dr. med. D. Ringleb

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-D. Klenk

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ch. Scholtissek



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung	1
B. Problemstellung	8
C. Material und Methoden	9
1. Medien, Lösungen und Substanzen	9
2. Zellkulturen	10
3. Viren	11
4. Infektionsmodus der Zellen	12
5. Fusion	12
6. Hämagglutinationsreaktion	13
7. Plaque-Test	14
8. Polyacrylamidgel-Elektrophorese	15
D. Ergebnisse	21
1. Erforderliche Konzentration und Wirkzeit von 2-Desoxy-D-Glucose und D-Glucosamin zur Fusionshemmung	21
2. Hemmung der SV5-induzierten Zellfusion	22
3. Hemmung der NDV-induzierten Zellfusion	24
4. Hemmung der Virusproteinsynthese bei NDV	25
5. Abbildungen	29
E. Diskussion	43
F. Zusammenfassung	52
G. Literaturverzeichnis	54
H. Verzeichnis verwendeter Abkürzungen	65
Lebenslauf	

A. EINLEITUNG

Das Simian Virus 5 (SV5) und das Newcastle disease Virus (NDV) werden der Paramyxovirusgruppe zugeordnet (MELNICK, 1973). Hinsichtlich ihrer physikalisch-chemischen und biologischen Eigenschaften sind sie den Orthomyxoviren, also den Influenzaviren, sehr ähnlich. Beide Gruppen zusammen repräsentieren die Myxoviren (Übersichten bei SCHOLTISSEK et al., 1969; COMPANS und CHOPPIN, 1971; KLENK, 1974).

Das Ribonukleinsäure (internationale Abk.: RNA) enthaltende helikale Nukleokapsid wird von einer komplex aufgebauten Hülle, die an ihrer Oberfläche stiftförmige Protrusionen aufweist, umgeben. Bei den Orthomyxoviren beträgt der Durchmesser des Nukleokapsids 6 - 9 nm und der des Virion 90 - 120 nm, bei den Paramyxoviren ergeben die entsprechenden Abmessungen 18 nm beziehungsweise 150 - 300 nm. In beiden Virusgruppen kommen neben sphärischen Partikeln auch filamentöse Gebilde vor, die eine Länge von mehr als 1 000 nm erreichen können. Die Protrusionen auf der Virusoberfläche sind 8 - 10 nm lang. Bezogen auf das Trockengewicht bestehen die Orthomyxoviren aus 0.7 - 1% RNA, 70 - 75% Proteinen, 20 - 24% Lipiden und 5% Kohlenhydraten, die Paramyxoviren aus 0.9% RNA, 73% Proteinen, 20% Lipiden und 6% Kohlenhydraten.

Die Kenntnisse über die Biosynthese und Morphogenese der Myxoviren sind zwar noch lückenreich, an Influenza- und Parainfluenzaviren gewonnene Befunde erlauben jedoch die hier stark vereinfachte Vorstellung davon. Vom Virusgenom initiiert, kodiert und gesteuert verläuft die Virusproteinsynthese durch die Wirtszelle. Dabei wird sehr unterschiedlich die zelluläre Proteinsynthese beeinträchtigt, beispielsweise um weniger als 1% durch SV5 und um mehr als 80% durch NDV (CHOPPIN und HOLMES, 1967; HIGHTOWER und BRATT, 1974).

Es kommt intracytoplasmatisch in den membranarmen Gebieten der Zelle zur Anreicherung von helikal strukturierten Nukleokapsidproteinen, die das identisch replizierte Tochter-Virusgenom beherbergen (COMPANS et al., 1967). Darüber hinaus werden an viruskodierte Polypeptidketten durch wirtszellspezifische Glykosyltransferasen stufenweise verschiedene Zucker angeheftet (STANLEY et al., 1973; COMPANS, 1973b). Die entstehenden Glykoproteide wandern vom rauhen endoplasmatischen Retikulum zu den glatten Membranen zum Teil unter Bildung von Spaltprodukten (KLENK und ROTT, 1973) und werden schließlich in die Zellmembran inkorporiert, indem sie sich mit ihren hydrophoben Polypeptidenden in der zellulären Lipidmembran nach außen gerichtet verankern (COMPANS, 1973a; KLENK et al., 1974a, b). Ebenso wandert ein virusspezifisches

kohlenhydratfreies Protein vom rauhen zum glatten endoplasmatischen Retikulum, um sich letztlich an der Innenseite der zellulären Lipidmembran anzulagern (COMPANS und DIMMOCK, 1969; COMPANS et al., 1970; KLENK, 1974). Erst gegen Ende dieser selektiv punktuellen Vorveränderung der Zelloberfläche werden elektronenoptisch verfolgbare Phasen der Viruspartikelreifung sichtbar. Direkt unter der vorveränderten Zellmembran reihen sich jetzt die Nukleokapsidproteine auf und gleichzeitig bilden sich an der Zelloberfläche kleine stiftförmige Protrusionen, die entsprechend ihrer englischen Benennung als "spikes" bezeichnet werden. Knospenförmig wölbt sich ein solches Protrusionen tragendes Membranareal in den freien Raum und umhüllt dabei das Nukleokapsidprotein, schnürt sich von der übrigen Zelle ab und stellt dann das ausgeschleuste reife Virion dar (CHOPPIN et al., 1971). Die Virushülle besteht also auf der Innenseite aus dem kohlenhydratfreien Membranprotein (COMPANS et al., 1970; COMPANS, 1973a; KLENK, 1974), im Zentrum aus der von der Wirtszelle stammenden Lipidschicht (KLENK und CHOPPIN, 1969, 1970) und auf der Außenseite in Form der spikes aus Glykoproteiden. Bei SV5 und NDV bestehen diese spikes aus 2 Glykoproteiden (CHEN et al., 1971). Das größere davon mit einem Molekulargewicht von 65 - 70 000 weist sowohl Hämagglutinations- (HA) wie auch Neuraminidase- (NA) Aktivitäten auf, das kleinere mit einem Molekulargewicht

von 53 - 56 000 wird mit einer gegenüber den Influenzaviren zusätzlichen Eigenschaft, nämlich der Fusions- und Hämolyse-Aktivität in Zusammenhang gebracht (MOUNTCASTLE et al., 1971; SCHEID und CHOPPIN, 1973).

Die Fusion von Zellen unter Aufhebung der Zellgrenzen und Ansammlung der daran beteiligten Zellkerne in einem zytoplasmatischen Großraumverband ist als physiologisches wie pathophysiologisches Phaenomen seit über einem Jahrhundert bekannt (Übersicht bei POSTE, 1970). MÜLLER (1838) beobachtet als erster multinukleäre Zellen in Tumoren, ROKITANSKY (1855) in tuberkulös infiziertem Gewebe, LUGENBÜHL (1873) und WEIGERT (1874) in Pockenpusteln. Heute sind die Pockenviren, die Herpesviren und die Paramyxoviren als Induktoren einer Polykaryozytose sowohl im Organismus wie in der Zellkultur bekannt (Übersicht bei ROIZMAN, 1962; POSTE, 1970). Das Phaenomen der virusinduzierten Zellfusion hat nicht nur per se Interesse gefunden, sondern auch als Arbeitsmethode in vielen Bereichen der Biologie, insbesondere auf dem Gebiet der Onkologie. So gelang die Zellhybridisierung verschiedener Spezies durch Zugabe von inaktivierten Sendai Viren (HARRIS und WATKINS, 1965). Die Bedeutung der Fusionierbarkeit verschiedener Zellen erhellt aus der Tatsache, daß beispielsweise das für Goldhamster onkogene SV40 Virus in transformierten Zellen aufgedeckt werden kann durch eine Hybridisierung mit permissiven Zellen (WATKINS, 1971).

Der Mechanismus der Zellfusion ist bislang nicht genau bekannt (KLENK, 1974). Bei normalen, nicht infizierten Zellen wird bei der Pinozytose eine Einstülpung der Zelloberfläche beobachtet; hierbei fließen die dabei sich abschnürenden Anteile ineinander um eine kleine Vesikel zu bilden. Das entstehende Loch in der Zellmembran wird ebenfalls durch ein Wieder-Ineinanderfließen der Membranen "repariert". Es findet also gewissermaßen eine Fusion der Zellmembran mit sich selbst statt (HOLMES, 1968). Untersuchungen an Erythrozyten, die mit dem Parainfluenzavirus Sendai inkubiert wurden, konnten elektronoptisch sicherstellen, daß die Virushülle mit der Membran des roten Blutkörperchens fusioniert (HOWE und MORGAN, 1969; APOSTOLOV, K. und ALMEIDA, J.D., 1972). Mit NDV behandelte Erythrozyten inkorporieren in ihre Membran die Hüllenantigene des Virus (DRZENIEK et al., 1966). Liegen nun die Zellen dicht aneinander, wie das beispielsweise bei der Einschichtkultur der Fall ist, so ist vorstellbar, daß bei engem Kontakt mit vielen Viruspartikeln nach der Fusion von deren Hüllen mit der Zellmembran die Oberflächen-"Reparatur" der Zelle durch sich selbst nicht mehr stattfindet, sondern sich zu den benachbarten Zellen zytoplasmatische Brücken bilden, die schließlich in eine Zellfusion münden (HOLMES, 1968).

Wie dem auch sei - der Potentialis verdeutlicht den Kenntnisstand auf diesem Gebiet! -, als Fusionogen bei SV5 und NDV wird das in den Hüllenprotrusionen befindliche kleinere Glykoproteid vermutet (SCHEID et al., 1972; SCHEID und CHOPPIN, 1973).

Zur Klärung der Frage, ob dieser postulierte Fusionsfaktor tatsächlich das fusionogene Substrat ist, lag es nahe Substanzen zu suchen, die selektiv auf die virus-spezifische Glykoproteidsynthese einwirken. KILBOURNE (1959) berichtet über die Hemmung der Influenzavirus-Multiplikation durch das Glucosederivat 2-Desoxy-D-Glucose. KALUZA et al. (1972) untersuchen den Effekt von 2-Desoxy-D-Glucose und D-Glucosamin auf die Vermehrung verschiedener RNA-haltiger Viren, die eine Glykoproteid-haltige Hülle besitzen. Sie beschreiben eine virusunterschiedliche Depression der Multiplikation, wobei die Virus RNA-Synthese sowie die Nukleokapsid-Antigen-Aktivitäten nicht beeinträchtigt sind. Nachfolgend konnte bei Influenza gesichert werden, daß die Glucose-Derivate in erster Linie die Glykoproteidsynthese inhibieren (KLENK et al., 1972; GANDHI et al., 1972).

Diese Befunde ermunterten zu der Annahme, daß bei SV5 und NDV, die das als Fusionsfaktor inkriminierte kleinere Glykoproteid in ihrer Hülle besitzen, die Zell-

fusion durch 2-Desoxy-D-Glucose und D-Glucosamin gehemmt werden kann.

Die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden mit SV5 und NDV durchgeführt, da beide Viren in hohem Ausmaß fusionogen wirken (HOLMES, 1968; KOHN, 1965) und sich als klassische Vertreter der Paramyxovirusgruppe einander sehr ähnlich sind (MOUNTCASTLE et al., 1971). Im Gegensatz zu SV5 veranlaßt das Virusgenom von NDV eine weitgehende Reduktion der zellulären Proteinsynthese (s. S 2), wodurch die Virusproteinsynthese mit Hilfe der Polyacrylamid-gel-Elektrophorese verfolgbar wird.

B. PROBLEMSTELLUNG

Die vorliegende Arbeit sucht folgende Fragen zu beantworten:

1. Ist die SV5- und NDV-induzierte Fusion von BHK21-F-Zellen durch die Glucosederivate 2-Desoxy-D-Glucose und D-Glucosamin hemmbar?
2. Treten im Falle einer Fusionshemmung Veränderungen in der Produktion infektiöser Partikel auf?
3. Läßt sich im Modellsystem BHK21-F-NDV durch die Analyse der Virusproteinbildung klären, ob im Falle einer Fusionshemmung diese durch eine spezifische Einwirkung der Glucose-Derivate auf die Synthese eines postulierten viralen Fusionsfaktors zustande kommt?

C. MATERIAL UND METHODEN

1. Medien, Lösungen, Substanzen

Das verstärkte Eagle's Medium (englisch: reinforced Eagle's medium, REM) besteht aus dem sog. Eagle's minimal essential medium (EAGLE, 1959) mit einer verdoppelten Menge der Aminosäuren, einer vervierfachen Menge der Vitamine sowie einer 4.5fach höheren Glucosekonzentration (BABLANIAN et al., 1965).

Das Earle's Medium (EARLE, 1943) enthält die doppelte Menge an Glucose gegenüber dem Originalrezept.

Diese beiden Medien wurden selbst zubereitet. Das Lavit-Medium stammt von der Firma Serva, Heidelberg und trägt die Bezeichnung PM13.

Als Mediumzusätze kamen Tryptosephosphat Bouillon (TPB) und fetales Kälberserum (FKS) zur Anwendung. Beide Substanzen wurden von der Firma Flow, Bonn, bezogen.

Die gepufferte Phosphatlösung (PBS) (DULBECCO und VOGT, 1954) wurde ohne Antibiotika-Zusätze bereitet.

Die Trypsin-Versen-Lösung entspricht der Rezeptur von BONIN (1973).

D-Glucosamin·HCl ($C_6H_{13}NO_5 \cdot HCl$) und 2-Desoxy-D-Glucose ($C_6H_{12}O_5$) (Firma Serva, Heidelberg) wurden als 1 M Basislösung mit pH 7.2 bei $-20^{\circ}C$ gelagert und in den Versuchen entsprechend der jeweils gewünschten Konzentration mit dem jeweilig verwendeten Medium verdünnt.

2. Zellkulturen

a) Primäre Rhesusaffennieren-Zellen (RhMK) wurden von der Firma Flow, Bonn, in Suspensionsform bezogen, in Vierkantflaschen mit dem Wachstumsmedium REM und 10% FKS ausgesät und nach Anwachsen eines Zellrasens zur Vermehrung von SV5 benutzt. Eine vorbestehende Kontamination durch SV5 wurde ausgeschlossen.

b) Primäre Hühnerfibroblasten, analog der von KRAUS und SCHÄFER (1963) angegebenen Methode gewonnen, wurden in Plastikpetrischalen von 50 mm Durchmesser (Firma Greiner, Nürtingen) in Lavit-Medium mit 10% FKS kultiviert. Der einschichtige Zellrasen ist nach 24 Stunden ausgebildet und weist je Schälchen $8 - 9 \times 10^6$ Zellen auf.

c) BHK21-F-Zellen sind eine heteroploide Variante der BHK21/C13-Zellen (HOLMES, 1968) und stammen vom Virus Laboratory, Rockefeller Foundation, New York. Sie wurden ebenfalls in Plastikpetrischälchen von 50 mm Durchmesser im Wachstumsmedium REM mit 10% FKS und

10% TPB ausgesät und zweimal wöchentlich nach Trypsin-Versen-Behandlung im Vermehrungsverhältnis 1 : 20 passagiert. Der ausgewachsene Zellrasen besteht aus $2 - 3 \times 10^6$ Zellen.

Alle Zellen wurden bei der Kultivierung und in den Versuchen bei 37°C in angefeuchteter Atmosphäre unter 5% CO_2 -Begasung gehalten.

3. Viren

a) SV5-W3 (CHOPPIN, 1964) erhielten wir freundlicherweise vom Virus Laboratory, Rockefeller University, New York. Das Virus wurde in primären RhMK-Zellen vermehrt und 2 Tage nach Inokulation mit einem Hämagglutinationstiter (HA-Titer) von 2^{-8} aus dem Kulturmedium geerntet. Die Lagerung erfolgte unter Zusatz von 10% FKS bei -70°C .

b) NDV, Stamm "Italien" (SCHÄFER, 1950) verdanken wir Herrn Professor Rott, Gießen. Die Virusvermehrung erfolgte durch Beimpfung 11 Tage alter bebrüteter Hühnerembryonen, deren Eiflüssigkeit 36 Stunden später geerntet wurde (BAQUERO, 1972). Sie enthielt etwa 500 HA-Einheiten. Das Virus konnte ohne Zusätze bei Gleichbleiben des HA-Titers eine Woche bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden.

4. Infektionsmodus der Zellen

Die Beimpfung der Zellkulturen erfolgte 16 - 24 Stunden nach Ausbildung eines kompletten einschichtigen Zellrasens, bei SV5 mit ca. 25 Plaque bildenden Einheiten (PBE) pro Zelle und einem HA-Titer von 2^{-7} , bei NDV mit ca. 250 PBE und einem HA-Titer von 2^{-8} .

Vorgehen: Das Wachstumsmedium wurde von den Kulturschälchen abgesogen, der Zellrasen zweimal mit auf 37°C vorgewärmtem PBS gewaschen und je Schälchen 0,5 ml Virus-suspension inokuliert. Die Adsorptionszeit betrug bei SV5 90 Minuten, bei NDV 30 Minuten. Während dieser Inkubation wurden alle 10 Minuten die Kulturplatten im Brutschrank vorsichtig geschwenkt. Danach wurde das Inokulum abgesogen, der Zellrasen viermal mit vorgewärmtem PBS gewaschen und je Schälchen 2 ml REM mit 2% FKS (und den entsprechend der Versuchsfragestellung beigemengten Substanzen) hinzugefügt.

Als Infektionszeitpunkt gilt der erste Kontakt von Virus und Zellkultur, in den Zeitangaben "post infectionem" (p.i.) ist also die Adsorptionszeit mit einbegriffen.

5. Fusion

Die Morphologie der beimpften Zellkulturen wurde in einem Wärmerraum bei 37°C durch das Zeiss Umkehrmikroskop

UPL im Phasenkontrast bei 125facher Vergrößerung stündlich - bei SV5 ab der 10. Stunde p.i., bei NDV ab der 5. Stunde p.i. - überprüft, protokolliert und photographisch mit einer Leica M3 dokumentiert. Das Ausmaß der Fusion wurde als Prozentrage der fusionierten Zellen gegenüber den nicht fusionierten festgehalten (LUDWIG et al., 1974). Es wurden hierzu jeweils die Schätzwerte von 5 betrachteten Gesichtsfeldern in der o.g. Vergrößerung pro Platte gemittelt. In mehreren Versuchsansätzen sonderten wir zu bestimmten Zeiten p.i. Kulturschälchen aus, färbten die Zellen nach in der von KOHN (1965) angegebenen Weise (Vorbehandlung mit 0.02%igen EDTA, Formolfixierung, Giemsaefärbung) und hielten das morphologische Zellbild photographisch fest.

6. Hämagglutinationsreaktion

Der HA-Test wurde bei beiden Viren nach DAVENPORT et al. (1960) mit 1%igen Hühnererythrozyten im Kühlraum bei +4°C durchgeführt. Die Ablesung erfolgte bei SV5 nach 70 Minuten, bei NDV nach 45 Minuten. Der reziproke Wert der höchsten Verdünnungsstufe der Virussuspension, die eine komplette Agglutination (= 4fach positiv) zeigt, gibt die Titerhöhe in Hämagglutinations-Einheiten (HAE) an. Die HAE bezieht sich auf 0.4 ml Virussuspension.

7. Plaque-Test

a) Bei SV5 erfolgte die Ausführung des Plaque-Testes in Anlehnung an HOLMES und CHOPPIN (1967) in BHK21-F-Zellkulturen. Zu den gewünschten Zeiten p.i. wurden jeweils 2 Kulturplatten dem Brutschrank entnommen, der Zellkulturüberstand, also das Medium, abgesogen, in ein Röhrchen zusammengegeben und ohne weiteren Zusatz kurzfristig (maximal 24 Stunden) bei -70°C aufbewahrt. Der Zellrasen der beiden Schälchen wurde zweimal mit kaltem ($+4^{\circ}\text{C}$) PBS gewaschen, dann mit einem Gummistückchen abgekratzt, in kaltem PBS aufgenommen und in einem Röhrchen 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Der aus den Zellen bestehende Bodensatz wurde dann in 1 ml aqua bidestillata suspendiert und durch Ultraschall (5 Sekunden, Stufe II bei dem Gerät Sonifier El2 der Firma Branson Sonic Power Company, Danbury, Conn., USA) homogenisiert, danach ebenfalls nur kurzfristig bei -70°C gelagert. Die Titration des virushaltigen Materials in 10er Potenzen erfolgte in REM bei $+4^{\circ}\text{C}$. Je Verdünnungsstufe wurden 2 Schälchen in der o.g. Weise beimpft. Als Übersichtsmedium verwendeten wir ein Gemisch aus 4 ml zweifach konzentriertem REM mit 4% FKS und 4 ml 1.4% Difco-Agar in aqua bidestillata. Nach Erstarren des Agars bei Raumtemperatur wurden die Kulturschälchen umgedreht und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 -Begasung inkubiert. Am 5. Tag färbten wir mit 0,025%igen Neutralrot

in PBS (2 ml je Schälchen) 2 Stunden und führten die Zählung der makroskopisch sichtbaren Plaques durch.

b) Bei NDV benutzten wir primäre Hühnerfibroblasten-Kulturen. Die Durchführung entspricht dem Vorgehen bei SV5 mit dem Unterschied, daß die Virusadsorptionszeit hier 30 Minuten betrug und die Plaque-Zählung am 4. Tag erfolgte.

8. Polyacrylamidgel-Elektrophorese

a) Die radioaktiven Substanzen [$U-^{14}C$]Proteinhydrolysat (57 mCi/m Atom), L-[3,5- 3H]Tyrosin (49 Ci/mmol), L-[4,5- 3H]Leucin (55 Ci/mmol), L-Valin-2,3- H_3 (u) (2 Ci/mmol), D-[1- 3H]Glucosaminhydrochlorid (3 Ci/mmol) wurden von der Firma Amersham, Braunschweig, bezogen. ✍

b) Vorgehen: Grundsätzlich wurden alle radioaktiven Substanzen in Earle's Medium angeboten, nachdem die Kulturplatten zweimal mit vorgewärmten PBS gewaschen worden waren. Die Markierungs-Zeit betrug bei [3H]-Glucosamin 3 Stunden, bei den übrigen Substanzen 1 Stunde, die Dosierung von [3H]-Glucosamin betrug 50 $\mu Ci/ml$, die der einzelnen [3H]-Aminosäuren 10 $\mu Ci/ml$, die des [^{14}C]Proteinhydrolysates 1 $\mu Ci/ml$. Die Ernte der Zellen entspricht zunächst dem beim Plaquetest beschriebenen Vorgehen, das Zellsediment wird dann jedoch nur in 0.5 ml aqua bidestillata

homogenisiert, diesem Homogenisat wird 50 λ SDS (engl.: Sodiumdodecylsulfate) und 50 λ 2-Mercaptoäthanol hinzugefügt, das Gemisch wurde 1 Minute auf 100°C erhitzt und kann dann bei -20°C aufbewahrt werden. Die Herstellung der Polyacrylamidgele und die Durchführung der Elektrophorese erfolgte nach der von LÄMMLI (1970) angegebenen Methode. Hierbei wurden zunächst folgende Lösungen zubereitet:

1) 30% Acrylamid + 0.8% Bisacrylamid

30 g Acrylamid

0.8 g Bisacrylamid

mit H₂O auf 100 ml aufgefüllt.

2) Unterer Tris-Puffer (4fach)

18.17 g Tris-Base + 6 n HCl (20-25 ml)

4 ml 10% SDS

mit H₂O auf 100 ml aufgefüllt.

(ergibt 1.5 m Tris HCl/0.4% SDS) pH = 8.8

3) Oberer Tris-Puffer (4fach)

6.06 g Tris-Base + 6 n HCl

4 ml 10% SDS

mit H₂O auf 100 ml aufgefüllt.

(ergibt 0.5 m Tris HCl/0.4% SDS) pH = 6.8

4) Tris-Glycin Reservoir-Puffer (4fach)

12 g Tris-Base

57.6 g Glycin

mit H_2O auf 1000 ml aufgefüllt.

5) Probenpuffer

10 ml Glycerin

5 ml 2-Mercaptoäthanol

30 ml 10% SDS

12.5 ml oberer Tris-Puffer (4fach)

mit H_2O auf 100 ml aufgefüllt.

(ergibt 10% Glycerin, 5% 2-Mercaptoäthanol,

3% SDS + 0.0625 m Tris).

6) Bromphenol-Blau-Lösung

10 ml 0.2% Bromphenol-Blau-Lösung

10 ml Glycerin

7) Frisches Ammoniumpersulfat

200 mg Ammoniumpersulfat

auf 2 ml H_2O

8) Reservoir-Puffer

500 ml Tris-Glycin (4fach)

20 ml 10% SDS

mit H_2O auf 2000 ml aufgefüllt.

Zur Herstellung von 12 10%igen Polyacrylamidgelen
werden

16.6 ml H_2O

10.0 ml Unterer Tris (4fach)

13.3 ml 30% Acryl + 0.8 MBA

0.12 ml 10% AP (100 mg/ml)

gemischt, mit einer langgezogenen Pasteurpipette in ein
Röhrchen (innerer Durchmesser 4.5 mm) gefüllt und entgast;
dann fügt man 10 λ TEMED hinzu. Dieses untere Gel wird bis
zum vollständigen Auffüllen der 12 Röhrchen mit folgendem
Leerpuffer überschichtet:

3.0 ml H_2O

1.0 ml Unterer Tris (4fach)

0.013 ml Ammoniumpersulfatlösung

0.002 ml TEMED.

Sobald die Polymerisation abgeschlossen ist schüttet man
den Leerpuffer wieder ab, um nun die Lösungen des oberen
Gels zu mischen (Mengenangabe für 12 Gele):

3.25 ml H_2O

1.25 ml Oberer Tris (4fach)

0.01 ml Ammoniumpersulfatlösung.

Zwei Tropfen dieser Lösung werden auf jedes Gel aufgetragen,
zu dem Rest der Flüssigkeit gibt man 5 λ TEMED und bringt
davon mit einer Eppendorf-Pipette 0.25 ml auf das untere
Gel.

Diese oberen Gele werden jetzt bis zum Rand des Röhrchens mit dem Leerpuffer 2 aus

1.5 ml H_2O

0.5 ml Oberer Tris (4fach)

0.01 ml Ammoniumpersulfatlösung

0.002 ml TEMED

aufgefüllt. Nach Abschluß der Polymerisation und Abschütten des Leerpuffers werden die Röhrchen in die Elektrophoresekammer gestellt. Auf jedes Gel gibt man je 50 μ l der zu untersuchenden Probe mit je einem Tropfen Bromphenol-Blau-Lösung und je einem Tropfen Probepuffer und überschichtet mit Reservoir-Puffer. Für die Probenwanderung im oberen Gel werden je Röhrchen 2 Milliampere benötigt, für das untere Gel 3 Milliampere. Nach Beendigung der Elektrophorese entfernten wir das obere Gel mit einem Messer, lagerten das die Probe enthaltende untere Gel von einer Länge von 10 cm und einem Durchmesser von 4.5 mm bei $-20^{\circ}C$.

Das Schneiden der Gele in 1 mm-Abständen und die Vorbereitung für die Auswertung im Packard Tri-Carb-Szintillationszähler folgte den Angaben von CALIGUIRI et al. (1969), wobei statt NCS Soluene-100, Packard Instruments, verwendet wurde.

Bei der Erstellung der Co-Elektrophoresen verfahren wir zunächst in der o.g. Weise. Es wurden also die mit

einem Isotop ($[^3\text{H}]$ oder $[^{14}\text{C}]$) markierten Zellhomogenisate einzeln elektrophoriert und ausgewertet. Dann errechneten wir aus der Differenz der beiden Ergebniskurven das wahrscheinlich optimale Mischungsverhältnis, gaben in diesem die beiden noch gelagerten Proben zusammen und führten nun die eigentliche Co-Elektrophorese durch.

D. ERGEBNISSE

1. Erforderliche Konzentration und Wirksamkeit von 2-Desoxy-D-Glucose und D-Glucosamin zur Fusionshemmung

Die SV5 bzw. NDV-induzierte Fusion von BHK21-F-Zellen (Abb. 1 und 2, s. S. 29 ff.) und deren Hemmung wurde in glucosehaltigem Medium durchgeführt: REM enthält 24.75 mM Glucose. Bei einer 5 mM Konzentration der benutzten Glucosederivate ergibt sich ein Molaritätsverhältnis zur Medium-Glucose von 0.2 : 1, bei einer 10 mM Konzentration von 0.4 : 1 etc..

Die 40 mM Konzentration erwies sich bei beiden eingesetzten Glucose-Abkömmlingen als optimal: die Fusionshemmung ist eindeutig - wenn auch temporär, s.u. - und es zeigten sich keinerlei Hinweise für eine morphologisch faßbare Zellrasenveränderung im Sinne einer toxisch bedingten Reaktion über einen Beobachtungszeitraum von 32 Stunden.

In beiden Virus-Zell-Systemen gilt, daß die Fusionshemmung in einer 40 mM Konzentration der Hemmsubstanz nur möglich ist, wenn der Hemmzucker bis zur 4. Stunde p.i. dem Medium hinzugefügt wird.

Zeit p.i. (Std.n.) der Hinzufügung von	1.	2.	3.	4.	5.	6.
2-Desoxy-D-Glucose	+	+	+	+	+	-
D-Glucosamin	+	+	+	+	-	-

Zeit p.i. (Std.n.) der Wiederentfernungen von	1.	2.	3.	4.	5.	6.
2-Desoxy-D-Glucose	-	-	-	-	+	+
D-Glucosamin	-	-	-	-	+	+

Tab. 1 Erforderliche Wirkzeit von 2-Desoxy-D-Glucose und D-Glucosamin, um SV5 - bzw. NDV induzierte Fusion von BHK21-F-Zellen zu hemmen.

+ = Hemmung, - = keine Hemmung.

2. Hemmung der SV5 induzierten Zellfusion

Der Vermehrungszyklus von SV5 in BHK21-F-Zellen zeigt eine Latenz von 7 Stunden, eine Verdoppelung der Virusausbeute pro Stunde während der Periode des exponentiellen Anstieges und erreicht das Produktionsmyximum um die 14. bis 16. Stunde p.i. Der niedrige Ertrag infektiöser Partikel pro Zelle, nur ca. 10 PEE/Zelle, ist bekannt (HOLMES und CHOPPIN, 1966). Die Zellfusion beginnt zwischen der 10. und 12. Stunde p.i. morphologisch faßbar zu werden, schreitet dann rasch voran und erreicht durch Ausbildung eines kompletten Syncytiums zwischen der 14. und 16. Stunde

p.i. ihren Höhepunkt (Abb. 1 und 3). Charakteristisch und unterschiedlich zum NDV-BHK21-F-System ist hierbei die Lagerung der Zellkerne in Reihen. Das Syncytium desintegriert im allgemeinen ab der 28. Stunde p.i.

Bei Anwesenheit von 40 mM 2-Desoxy-D-Glucose kommt es bis zur 24. Stunde p.i. zu einer kompletten Fusionshemmung, zwischen der 24. und 26. Stunde p.i. beginnt sich dann die Syncytiumsbildung zu entwickeln. Die Fusionshemmung ist also temporär (Abb. 3 und 4). Die Vermehrungskurve zeigt zunächst wie im ungehemmten System eine Latenz von 7 Stunden, dann wird eine Verzögerung der Virusproduktion zwischen der 7. und 12. Stunde p.i. mit einer Ausdehnung der Verdopplungszeit der PBE von einer auf fünf Stunden sichtbar. Das Maximum der Virusaussbeute wird zwischen der 16. und 18. Stunde erreicht und liegt etwas mehr als eine Zehnerpotenz niedriger als im ungehemmten System (Abb. 3).

Bei Anwesenheit von 40 mM D-Glucosamin ergeben sich im Prinzip ähnliche Befunde. Es kommt zu einer zeitlichen Verschiebung der Entwicklung der Polykaryozytose bis zur 22. Stunde p.i. (Abb. 3 und 4), im Virusvermehrungszyklus ist die Produktionsverzögerung nach der Latenz nur von der 7. bis ca. 10. Stunde ausgeprägt und die Depression der gesamten Virusaussbeute ist geringer als bei 2-Desoxy-D-Glucose (Abb. 7).

3. Hemmung der NDV induzierten Zellfusion

Der Replikationszyklus von NDV in BHK21-F-Zellen verläuft deutlich schneller und ist ergiebiger als bei SV5. Nach einer Latenz von 2 bis 3 Stunden kommt es bis zur 6. Stunde p.i. nahezu zu einer Verzehnfachung der Plaquebildenden Einheiten je Stunde, nach 8 Stunden ist bereits das Maximum der Virusproduktion erreicht. Die Zellfusion setzt in der 6. Stunde p.i. ein und ist in der 10. Stunde p.i. komplett ausgebildet. Dabei lagern sich die Zellkerne in den Riesenzellen haufenförmig zusammen (Abb. 2 und 5). Die Desintegration des Zellrasens setzt in der 14. - 16. Stunde ein.

Sehr ähnlich denen im BHK-21-SV5-System sind hier die Wirkungen der beiden als Hemmsubstanzen eingesetzten Glucosederivate. Wiederum zeigt 2-Desoxy-D-Glucose den nachhaltigeren Effekt. Die Fusionsauslösung kann bis zur 11./12. Stunde p.i. verschoben werden, die Zuwachsrates der PBE von der 2. bis zur 6. Stunde p.i. ist auf eine Verdreifachung pro Stunde reduziert und die Virus-Gesamtausbeute liegt eine kanappe log 10-Stufe unter der im ungehemmten System (Abb. 5 und 6).

Bei D-Glucosamin ist der Hemmeffekt auf die Virusproduktion und die Entwicklung der Polykaryocytose prinzipiell der gleiche, nur geringer ausgeprägt (Abb. 5, 6 und 8).

4. Hemmung der Virusproteinsynthese bei NDV

Wie in der Einleitung dargelegt, konnte diese Untersuchung nur im BHK21-F-NDV-System durchgeführt werden. Bei der Benennung der einzelnen Virusproteine hielten wir uns an den Vorschlag von SCHEID und CHOPPIN (1974), da in den Abkürzungsbuchstaben ein Hinweis auf die Funktion des betreffenden Proteins angeboten wird. Fallend mit dem Molekulargewicht (in den Abbildungen von links nach rechts) lauten die Bezeichnungen: P (RNA-Polymerase-Komplex), HN (Hämagglutinin, Neuraminidase), F₀ (Vorläufer des Fusionsfaktors), NP (Nukleocapsid-Protein), F (Fusionsfaktor) und M (Membranprotein). Der zwischen NPF und M auftretende kleine Kurvengipfelpunkt wurde mit keinem Symbol versehen. MOUNTCASTLE et al. (1971) beschrieben beim Virion in dieser Region ein Protein und benennen es 5 ohne eine Angabe über seine eventuelle Funktion zu machen. SAMPSON und FOX (1974) und HIGHTOWER und ERATT (1974) finden hier keinen Hinweis auf ein Protein. In unseren Analysen fiel auf, daß genau in dieser Region sich der höchste Gipfel der Kontrollkurve der uninfizierten BHK21-F-Zellen befindet (Abb. 9).

Die Abb. 10 zeigt die in der 4., 7. und 11. Stunde p.i. gewonnenen Proteinprofile. Sie demonstriert, daß bereits zur 4. Stunde p.i. alle virusspezifischen Proteine nach-

weisbar sind. Da zu diesem Zeitpunkt die zelluläre Proteinsynthese noch teilweise erhalten ist, ergibt sich insgesamt ein höheres Hintergrund-Niveau der ZpM. Die hier noch hervorstechenden Kurvengipfelpunkte zwischen P und HN sowie zwischen F₀ und NPF sind zur 7. Stunde p.i. weitgehend verschwunden und zur 11. Stunde p.i. nicht mehr nachweisbar. Ob es sich dabei um rein zelluläres Protein oder um Virusprotein-Vorläufer handelt ist unklar. Weiterhin fällt der deutliche Rückgang des Kurvenmaximums zwischen NPF und M im Verlauf der Zeit p.i. auf und ebenso das gegenläufige Ansteigen des M-Proteins. Letzteres läßt darauf schließen, daß M im Verlauf der Infektion relativ spät gebildet wird.

Die entsprechenden Versuche in Gegenwart von 2-Desoxy-D-Glucose und D-Glucosamin wurden zur 4. und 7. Stunde p.i. durchgeführt (Abb. 11 und 12), da zu diesen Zeitpunkten eine Änderung der Virusproteinprofile eher erwartet werden kann, als zur 11. Stunde p.i., wo ja bereits die temporäre Fusionshemmung zu enden beginnt (vgl. Abb. 5). Bei beiden Fusionshemmsubstanzen läßt sich weder zur 4. noch zur 7. Stunde p.i. eine spezifische Einwirkung auf eines oder mehrere Virusproteine nachweisen. Der allgemeine Depressionseffekt ist gering, zur 4. Stunde etwas deutlicher als zur 7. Stunde p.i. und bei 2-Desoxy-D-Glucose ausgeprägter als bei D-Glucosamin. Bei dem letzt-

genannten Zucker ist die Zahl der ZpM im Bereich der Proteine P, HN und F₀ sogar eleviert.

Es schien daher notwendig zu klären, ob neben der als unspezifisch zu bezeichnenden Depression durch die Glucose-Derivate doch eine spezifische Veränderung eines der Glykoproteine HN, F₀, F vorliegt. Die Abb. 13 zeigt in der Doppelmarkierung, daß HN, F₀ und F (verborgen im NP) Glykoproteine sind. Bei Anwesenheit von 40 mM 2-Desoxy-D-Glucose als dem wirksameren Depressor ist keine spezifische Blockierung eines der drei genannten Glykoproteine nachweisbar (Abb. 14).

Zur 4. Stunde p.i. gelang es nicht, mit der Markierungssubstanz [³H]-Glucosamin auswertbare Ergebnisse zu erstellen. Der Grund hierfür ist in dem sehr langsamen Eindringen und Wiederaustreten des Glucosamins in und aus dem Zuckerstoffwechsel-Pool der Zelle zu suchen (PLAGEMANN und ERBE, 1973).

In Tabelle 2 sind die Veränderungen der Zahl der ZpM jeweils am Kurvengipfelpunkt der einzelnen Proteine im gehemmten System gegenüber dem ungehemmten in l v. H. angegeben. Sie verdeutlicht den Wirkungsgrad der Hemmsubstanzen auf die einzelnen Virusproteine.

	Zeit p.i. in Std.	P	HN	F _O	NPF	M
40 mM	4	66%	75%	86%	68%	87%
2-Desoxy-D-Glucose	7	74%	102%	85%	77%	63%
40 mM	4	95%	139%	90%	79%	94%
D-Glucosamin	7	109%	119%	128%	91%	78%

Tab. 2 Prozentabweichung der Zerfälle pro Minute am Kurvenmaximums des jeweiligen Proteins bei Anwesenheit von 2-Desoxy-D-Glucose bzw. D-Glucosamin gegenüber der ungehemmten Kontrolle im System BHK21-F-NDV.

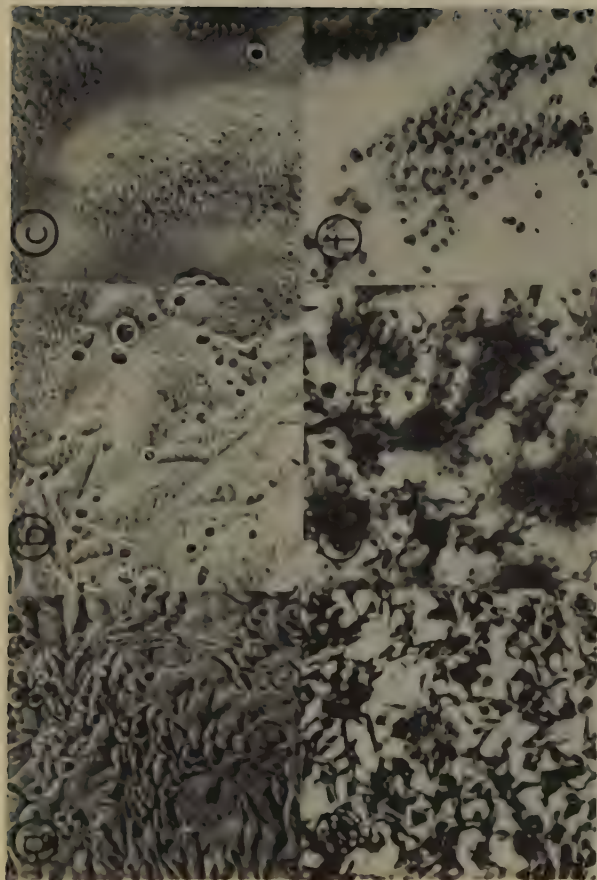


Abb. 1.: MHK21-F-Zellen + SV5 (Infektionsmodalitäten und photographische
Daten s. Material und Methoden). (a) 8. Std. p.i. 0% Fusion;
(b) 14. Std. p.i. 50-60% Fusion; (c) 18. Std. p.i. 100% Fusion;
(d) - (f) zeigt den jeweils gleichen Zustand nach Vorbehandlung
mit LDTA und Giemsa-Färbung (s. Material und Methoden).

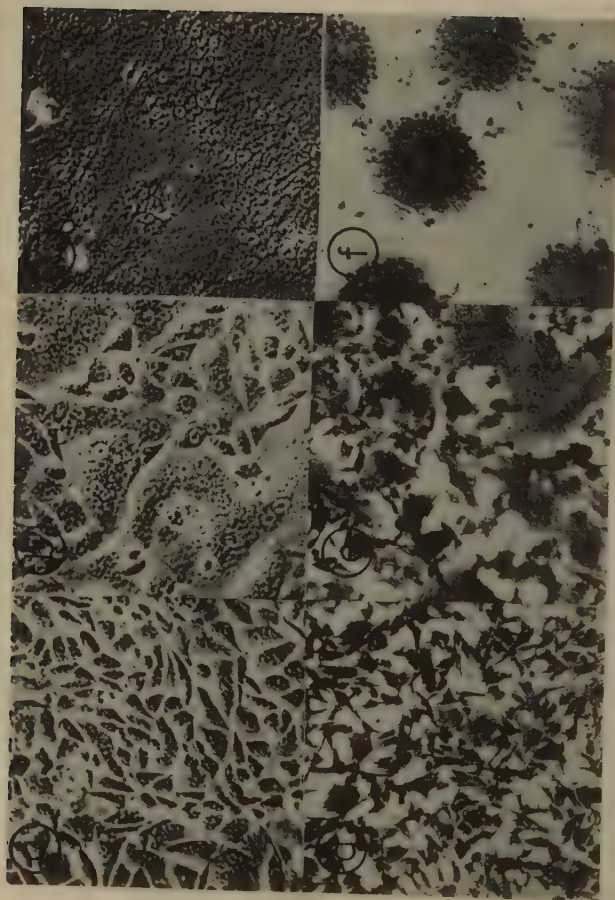


Abb. 2.: BHK21-F-Zellen + NDV (Versuchs-Daten s. Abb. 1). (a) und (d)
6. Std. p.i. 0% Fusion; (b) und (e) 8. Std. p.i. 50-60% Fusion;
(c) und (f) 10. Std. p.i. 100% Fusion.

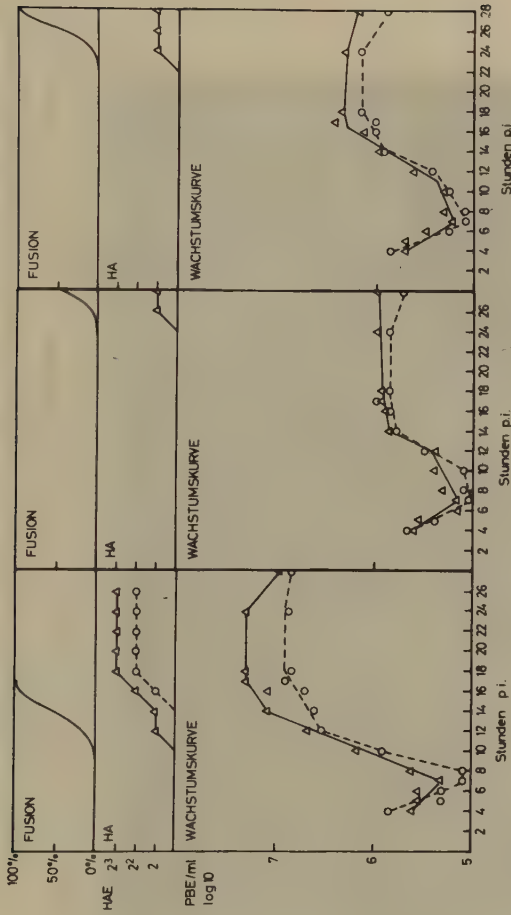


Abb. 3.: Fusion, HA-Titer und Wachstumskurve im BHK21-F-SV5-System.

Links: ohne Hemmsubstanz. Mitte: Zugabe von 40 mM 2-Desoxy-D-Glucose 90 Min. p.i. Rechts: Zugabe von 40 mM D-Glucosamin 90 Min. p.i.

Δ — Δ : zellassoziierte, $\circ$ — $\circ$: zellungebundene Virusaktivitäten.



Abb. 4.: Euk21-F-Zellen + SV5 (Versuchs-Daten s. Abb. 1). (a) bis (c) bei Anwesenheit von 40 mM Desoxy-D-Glucose: (a) 18. Std. p.i. (vgl. Abb. 1); (b) 24. Std. p.i.; (c) 28. Std. p.i.; (d) bis (f) zeigen zu den entsprechenden Zeiten p.i. den Zellrasen bei Anwesenheit von 40 mM D-Glucosamin.

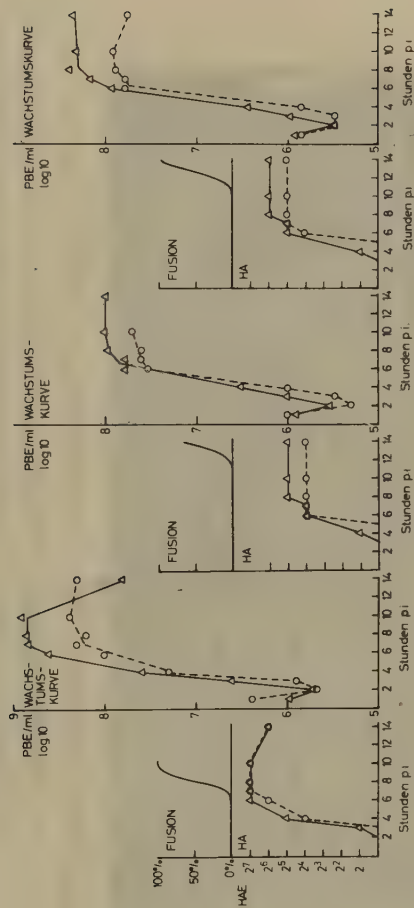


Abb. 5.: Fusion, HA-Titer und Wachstumskurve im BHK21-F-NDV-System.

Links: ohne Hemmsubstanz. Mitte: Zugabe von 40 mM 2-Desoxy-D-Glucose 30 Min. p.i. Rechts: Zugabe von 40 mM D-Glucosamin 30 Min. p.i.

Δ—Δ: zellassozierte, ○—○: zellungebundene Virusaktivitäten.

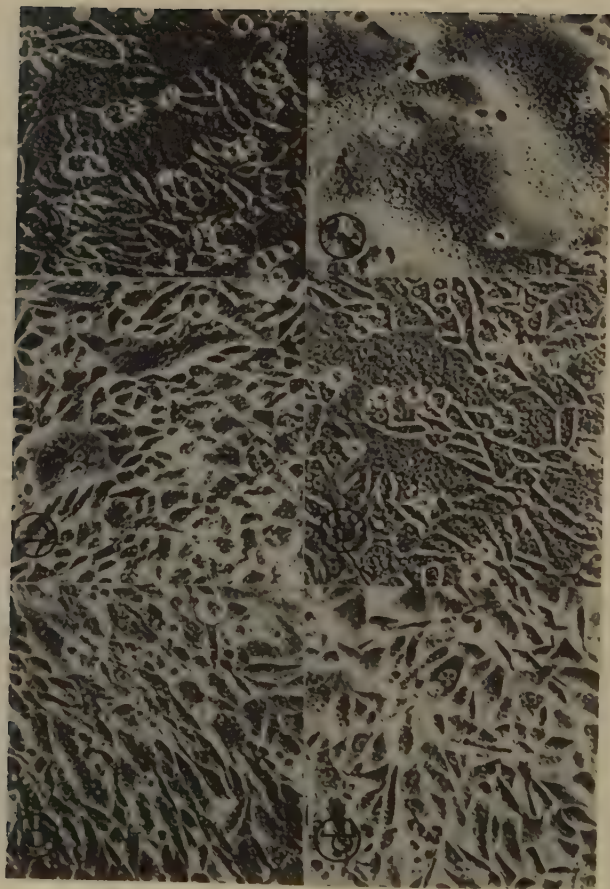


Abb. 6.: BHK21-F-Zellen + NDV (Versuchs-Daten s. Abb. 1). (a) bis (c) bei Anwesenheit von 40 mM Desoxy-D-Glucose: (a) 10. Std. p.i. (vgl. Abb. 2); (b) 12. Std. p.i.; (c) 14. Std. p.i.; (d) - (f) zeigen zu den entsprechenden Zeiten p.i. den Zellrasen bei Anwesenheit von 40 mM D-Glucosamin.

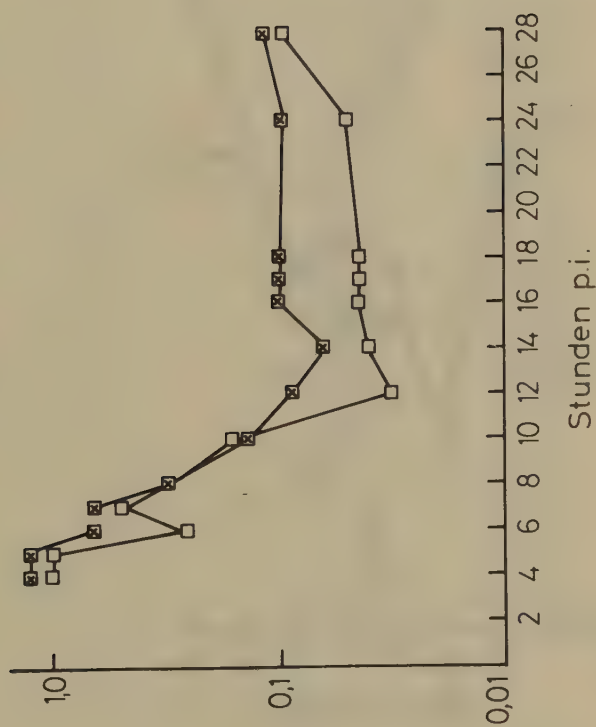


Abb. 7.: Abweichungsgrad der Wachstumskurve von SV5 + 40 mM 2-Desoxy-D-Glucose (□—□) bzw. von SV5 + 40 mM D-Glucosamin (○—○) von der Wachstumskurve von SV5 im ungehemmten System (= 1.0).

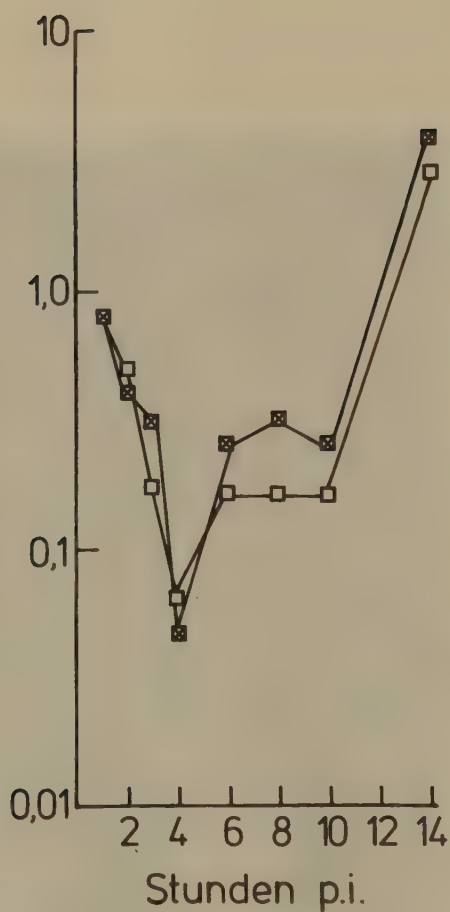


Abb. 8.: Abweichungsgrad der Wachstumskurve von NDV + 40 mM 2-Desoxy-D-Glucose (□—□) bzw. von NDV + 40 mM D-Glucosamin von der Wachstumskurve von NDV im ungehemmten System (= 1.0).

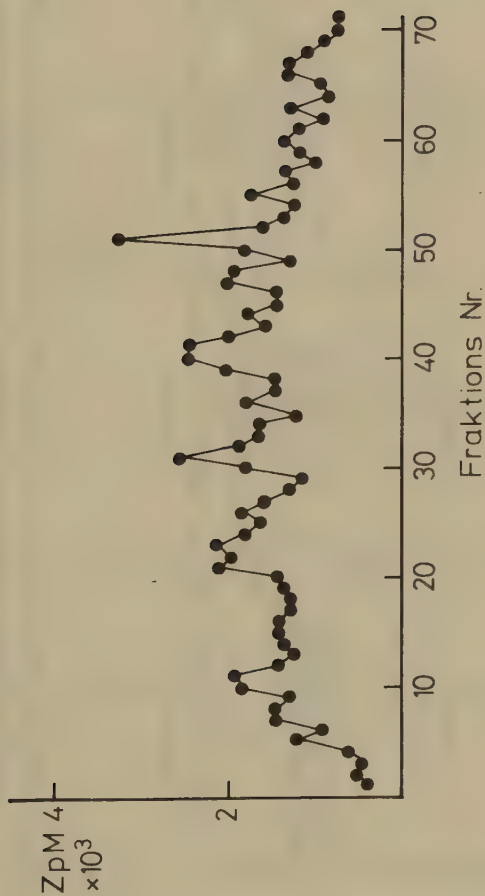


Abb. 9.: Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) der Polypeptide unfizierter BHK21-F-Zellen 72 Std. nach Zellansatz. Wanderung von links nach rechts. Radioaktive Markierung mit einem Gemisch aus [^3H]-Leucin, [^3H]-Tyrosin und [^3H]-Valin je 10 $\mu\text{Ci/ml}$. 1 Std. Markierungsdauer (s. Material und Methoden).

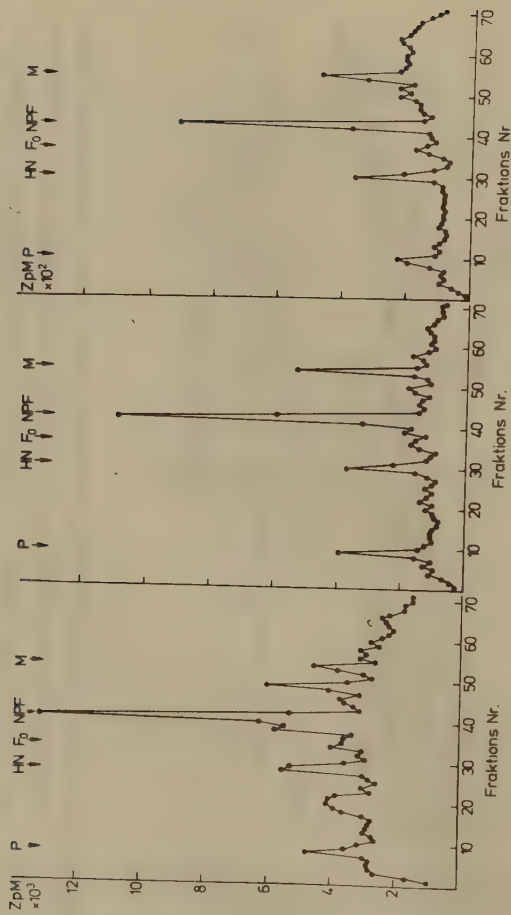


Abb. 10.: PAGE der Polypeptide von NDV in BHK21-F-Zellen. Markierung wie Abb. 8. Links: 4. Std. p.i. Mitte: 7. Std. p.i. Rechts: 11. Std. p.i. (beachte: rechts ist 2 pm eine Zehnerpotenz niedriger).

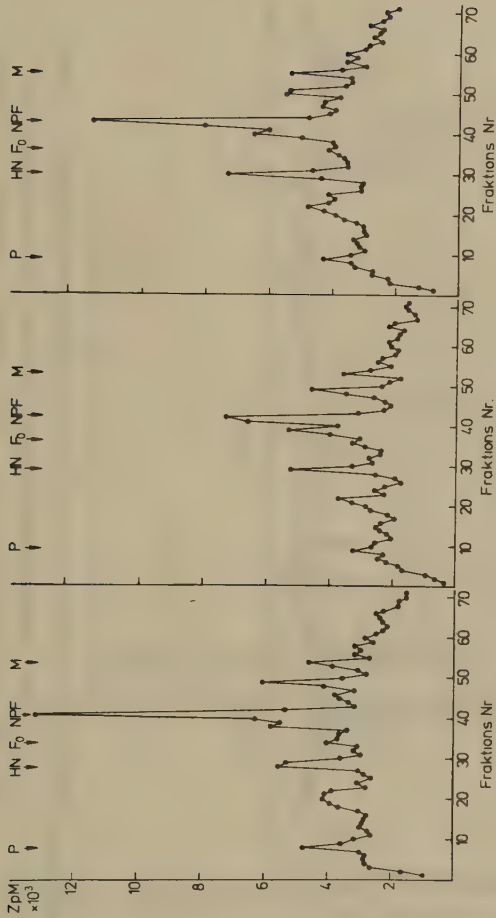


Abb. 11.: PAGE der Polypeptide von NDV in BHK21-F-Zellen zur 4. Stunde p.i. Links: ohne Hemmsubstanz. Mitte: Zugabe von 40 mM 2-Desoxy-D-Glucose 30 Min. p.i. Rechts: Zugabe von 40 mM D-Glucosamin 30 Min. p.i. Markierung wie Abb. 9.

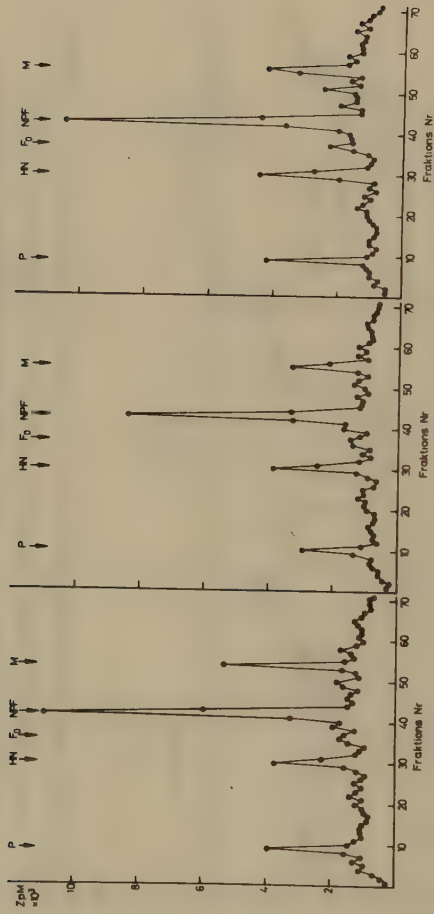


Abb. 12.: PAGE der Polypeptide von NDV in BHK21-F-Zellen zur 7. Std.
 p.i. Links: ohne Hemmsubstanz. Mitte: Zugabe von 40 mM
 2-Desoxy-D-Glucose 30 Min. p.i. Rechts: Zugabe von 40 mM
 D-Glucosamin 30 Min. p.i. Markierung wie Abb. 9.

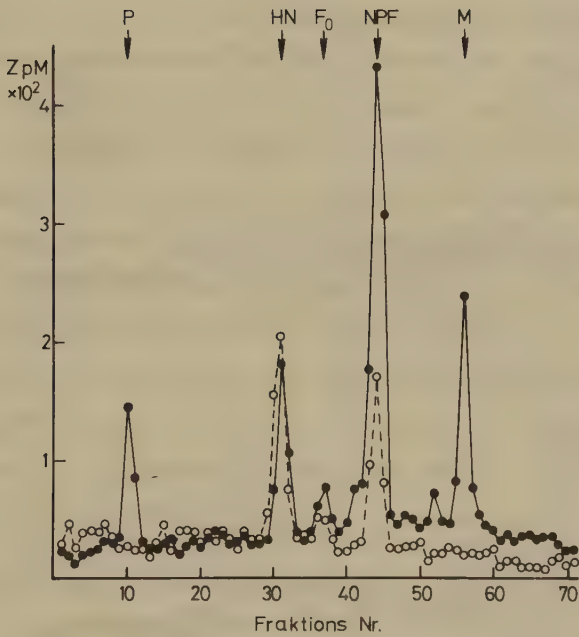


Abb. 13.: Co-Elektrophorese [^3H]-Glucosamin-markierter (o - o) Polypeptide und [^{14}C]-markierter Proteine (● — ●) von NDV 7. Std. p.i. zur Identifizierung der Glykoproteide HN, F_0 und F (Durchführung s. Material und Methoden).

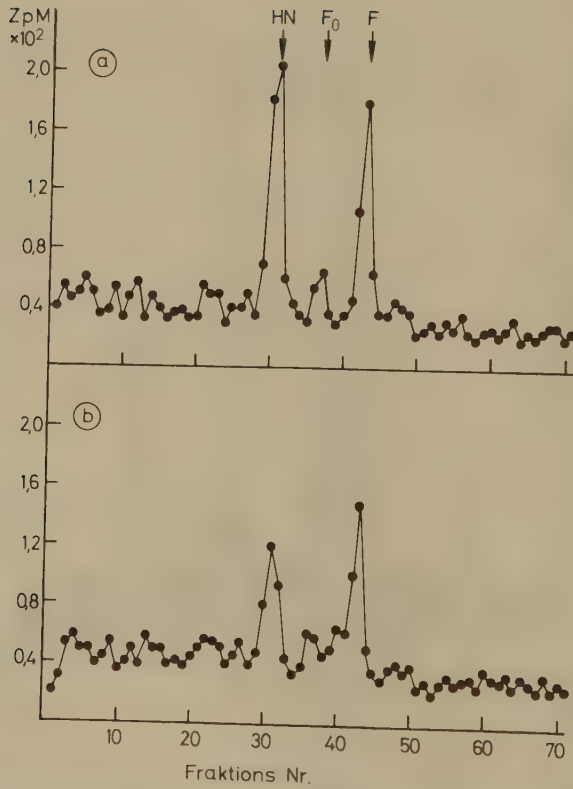


Abb. 14.: PAGE der Glykoproteide von NDV 7. Std. p.i. Markierung mit [^3H]-Glucosamin, Markierungsdauer 3 Std. a) NDV; b) NDV + 40 mM 2-Desoxy-D-Glucose.

E. DISKUSSION

Die durchgeführten Versuche beschäftigen sich mit den Wirkfolgen von 2-Desoxy-D-Glucose und D-Glucosamin auf die Induktion der Fusion von BHK21-F-Zellen durch die Infektion mit SV5 und NDV. Die Riesenzellbildung als ein Resultat neuformierten fusionogenen Substrates durch die Virus-Tochtergeneration, die sog. "Fusion von innen" (BRATT und GALLALER, 1969) ist Gegenstand der Untersuchungen. Die sog. "Fusion von außen" ist einer Beeinflussung durch Substanzen, die die Virusprotein-Neusynthese beeinträchtigen, nicht zugänglich. Hier kommt es bei Inokulation einer sehr hohen Viruspartikel-Zahl unabhängig von der Infektiosität - also auch bei inaktiviertem SV5 und NDV - zu einer Riesenzellbildung innerhalb von ein bis drei Stunden ohne daß eine Penetration des Virus in die Zelle stattzufinden braucht (HOLMES und CHOPPIN, 1966; KOHN, 1965).

Unsere Ergebnisse zeigen zunächst, daß die Paramyxovirus-induzierte Polykaryozytose zu einem morphologisch unterschiedlichem Riesenzell-Bild führt. SV5 bewirkt eine reihenförmige Zusammenlagerung der Zellkerne im Syncytium, bei NDV resultiert eine haufenförmige Zusammenballung der Zellkerne. Eine Erklärung für die offensichtlich virusabhängige verschiedene Reaktionsweise der BHK21-F-Zellen ist derzeit noch nicht bekannt. Die Zellfusion "von innen"

als solche ist durch die eingesetzten Glucose-Derivate hemmbar. Die hierzu erforderliche molare Konzentration der Hemmzucker gegenüber der der Medium-Glucose steht im Verhältnis 1,6 : 1. Die Zucker-Derivate können bis zur 4. Stunde p.i. dem Medium hinzugefügt werden, eine spätere Zugabe hat keine inhibierende Wirkung mehr. Die Fusionshemmung ist temporär. Der zeitliche Verzögerungsfaktor im Erscheinen der Fusion beträgt knapp 100%. Die Wachstumskurven beider Paramyxoviren in Gegenwart der Hemmsubstanzen zeigen gegenüber der ungehemmten Kontrolle a) keine Änderung der Viruslatenz im Replikationszyklus, b) eine Verzögerung der Zunahme infektiöser Partikel in der Zeiteinheit und c) eine insgesamt ca. 10fach erniedrigte Virusausschüttung. Sowohl die temporäre Unterdrückung der Fusion wie auch die Verzögerung und Depression der Viruspartikelbildung erlauben die Erklärung, daß die Hemmsubstanzen prozessual wirken, also einen Synthesemechanismus vorübergehend stören, aber nicht total blockieren.

KALUZA et al. (1972) beschreiben den Depressionseffekt von 2-Desoxy-D-Glucose und D-Glucosamin auf die Multiplikation verschiedener RNA-haltiger, umhüllter Viren. Es werden dieselben Vorbedingungen zur erfolgreichen Vermehrungshemmung mitgeteilt wie sie in unseren Vorversuchen eruiert wurden. Während der Durchführung der vorliegenden Arbeit gelang es GALLAHER et al. (1973), die NDV-induzierte

Fusion von BHK21-Zellen durch 2-Desoxy-D-Glucose zu hemmen. Diese Autorengruppe bestätigt ebenfalls die o.g. Vorbedingungen und berichtet von der Absenkung der Virusausbeute in der Größenordnung einer knappen 10-log-Stufe. Allerdings wird nur ein Bestimmungswert zur 11. Stunde p.i. und damit gewissermaßen eine Momentaufnahme mitgeteilt. Unsere Langzeitbeobachtung und Bestimmung der Produktion infektiöser Partikel in Kurzabständen zeitigt neben der Deskription eines Phänomens auch Hinweise auf den Mechanismus der Fusionshemmung. So weist die durch die Hemmsubstanzen unberührte Latenzzeit auf eine ungestörte Adsorption und Penetration im Vermehrungszyklus der Viren hin. Die gedämpfte Viruszuwachsrates läßt einen offensichtlich zur Fusionsauslösung notwendigen Schwellenwert fusionogener Partikel (wie dies auch bei der sog. "Fusion von außen" erforderlich ist) erst zeitlich verzögert erreichen. Dies und die Senkung der Wachstumskurve kann Folge einer Beeinträchtigung der Virusproteinsynthese und/oder - evtl. konsekutiv - der Virusreifung sein. Ist schließlich eine genügende Zahl intakter Virionen produziert, setzt die Zellfusion ein.

Wo aber greifen die hemmenden Glucose-Derivate in den Stoffwechsel der Wirtszelle ein? Was ist über deren Wirkungsmechanismus bislang bekannt?

2-Desoxy-D-Glucose wird in Hefe sowohl durch UTP (wie Glucose) als auch durch GTP (wie Mannose) zu den entsprechenden Nukleosiddiphosphat-Derivaten aktiviert (BIELY und BAUER, 1968; BIELY et al., 1972). In Hühnerfibroblasten konnten neben diesen beiden Derivaten auch die folgenden aktivierten Stoffwechselzwischenprodukte von 2-Desoxy-D-Glucose identifiziert werden: das 6-Phosphat-, das 1-Phosphat-, das 1,6-Diphosphat- und das Gluconsäure-6-Phosphat (SCHMIDT et al., 1974). Nach Infektion von Hühnerfibroblasten mit dem zur Arbovirusgruppe zählenden Semliki Forest Virus (SFV) gelang darüber hinaus der Nachweis zugefügter radioaktiv markierter 2-Desoxy-D-Glucose in den virusspezifischen Glykoproteiden. Die dabei auftretende Multiplikationshemmung von SFV war durch Zugabe von Mannose komplett reversibel, durch Zugabe von Glucose mit deutlich geringerem Effekt wieder aufhebbar (KALUZA et al., 1973). Die Metabolisierung von 2-Desoxy-D-Glucose scheint also vornehmlich über das GDP-Derivat zu laufen und man kann vermuten, daß der Hemmzucker als Analogon für Mannose in die Kohlenhydratketten eingebaut wird und dadurch eine weitere Verlängerung der Zuckerketten verhindert (KLENK et al., 1974b).

Über den Wirkungsmechanismus von D-Glucosamin ist fast nichts bekannt. SCHOLTISSEK (1971) konnte in Hühnerfibroblasten eine erhebliche Senkung des UTP-Pools durch Gluco-

samin zeigen. Es ist aber ungeklärt, ob dies zu einem Mangel aktivierter Zucker führt, da auch 2-Desoxy-D-Glucose eine Senkung des UTP-Vorrates bewirkt, eine Minderung der energetischen Leistungsfähigkeit der Zelle dadurch jedoch noch nicht nachweisbar ist (KALUZA et al., 1973; SCHOLTISSEK et al., 1974).

Trotz der geringen Information über die Wirkweise der beiden Glucose-Derivate auf der niedermolekularen Ebene bestehen differenzierte Vorstellungen über den Effekt auf die Bildung von Makromolekülen.

Bei der Synthese des Hämagglutinins von Influenza (vgl. Einleitung S. 2) wird in Hühnerfibroblasten das genetisch fixierte Primärprodukt HA durch zellspezifische Proteasen in HA₁ und HA₂ gespalten (KLENK und ROTT, 1973). Die Glykosylierung des Glykoproteids erfolgt stufenweise. Glucosamin und Mannose scheinen als erste Bausteine - gewissermaßen als Gerüst der Polysaccharidseitenketten - an das Polypeptid angeheftet zu werden (STANLEY et al., 1973; COMPANS, 1973b; KLENK et al., 1974b). Durch 2-Desoxy-D-Glucose und D-Glucosamin ist die Glykosylierung hemmbar (KLENK et al., 1972). Es tritt jetzt das un- oder teilglykosylierte Polypeptid HA₀ auf, das ebenso wie das im ungehemmten System entstehende HA von rauen endoplasmatischen Retikulum zu den glatten Membranen der Zelle wandert, gespalten wird und

dort als HA_{O1} und HA_{O2} nachzuweisen ist (KLENK et al., 1974a, b). Die schnellere Wanderungsgeschwindigkeit von HA_O gegenüber HA in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese erhärtet die Vorstellung, daß bei HA_O die Zuckerkomponente ganz oder teilweise fehlt, daß also die Hemmsubstanzen spezifisch in die Glykosylierung des Glykoproteids eingreifen.

Dieser spezifische Hemmeffekt konnte bei dem Paramyxovirus NDV weder zur 4. noch zur 7. Stunde p.i. nachgewiesen werden. Unsere Proteinprofile zeigen keine elektrophoretisch signifikante Beeinflussung der Glykoproteide, insbesondere keine Änderung der Wanderungsgeschwindigkeit, durch die Hemmzucker. Es kommt lediglich zu einer mehr oder weniger alle Virusproteine treffenden geringen Absenkung der entsprechenden Kurvengipfelpunkte, die bei Anwesenheit von 2-Desoxy-D-Glucose ausgeprägter erscheint als in Gegenwart von D-Glucosamin. Diese Befunde schließen nicht aus, daß im Verlauf der Virusproteinbildung, insbesondere der Glykoproteidsynthese, kurzfristig und vorübergehend Störungen auftreten. Die Puls-Zeiten von 1 Stunde bei den [3H]markierten Aminosäuren und von 3 Stunden bei dem [3H]markiertem Glucosamin können entsprechend kurzfristig auftretende eventuelle Synthese-Zwischenprodukte nicht aufdecken.

SAMSON und FOX (1974) beobachten im System Hühnerfibroblasten-NDV bei Zugabe von D-Glucosamin zur 5. Stunde p.i.

eine 3/4 Stunde später nach einer 15-minütigen Markierungsdauer mit ^3H -Isoleucin eine komplette Hemmung von HN und eine 60%ige Reduktion von F_0 ohne signifikante Beeinflussung von NPF. Wird nach der Markierung das radioaktive Isoleucin für eine weitere halbe Stunde durch Tritium-freies Isoleucin ersetzt und erst jetzt D-Glucosamin hinzugefügt, so findet man im ungehemmten System gegenüber dem zuerst zitierten Versuch deutlich weniger F_0 und im D-Glucosamin-behandelten System gegenüber der ungehemmten Kontrolle keinerlei Änderung des Polypeptidmusters. Die Autoren interpretieren ihre Ergebnisse als selektive Hemmung der Glykoproteidsynthese, die aber nach der Spaltung von F_0 zu F nicht mehr möglich ist. Diese Befunde stehen zwar im Widerspruch zu unseren Ergebnissen, aber in Übereinstimmung mit den o.g. Methodik-Überlegungen. Es ist durchaus denkbar, daß eine von uns nicht erfaßte kurzfristige Störung der Glykoproteidsynthese verantwortlich zeichnet für die Minderung der infektiösen Partikel und damit die Verzögerung des Auftretens der Zellfusion.

Publikationen jüngsten Datums lassen das fusionogene Substrat der Paramyxoviren als einen Komplex aus mehreren Faktoren erscheinen. HALL und MARTIN (1974) konnten beim Masernvirus - es besitzt ebenfalls 2 Glykoproteide an seiner Oberfläche - die spikes mit einem Teil der Lipidschicht isolieren. Das Isolat wies HA-, Fusions- und Hämolyse-Aktivität auf. Nach Entfernung der Lipide verschwand die Fusions- und Hämolyse-Aktivität. Sie wurde

regeneriert durch die Wieder-Hinzufügung der Lipide. Dissoziierte Hüllenbestandteile des Parainfluenzavirus Sendai ohne fusionogene Eigenschaften konnten rekonstituiert werden zu Partikeln, die aus beiden Glykoproteiden und der Lipidschicht bestanden und ihre Fusionseigenschaft wieder erlangten (HOSAKA, 1974). Beim Sendai Virus gelang auch die Identifizierung des kleineren Glykoproteids (MG ca. 56 000) als Fusionsfaktor. In verschiedenen Wirtszellen propagierte Sendai Viren mit hohem F_0 - und niedrigem F-Anteil und damit verbundener Fusionsinaktivität wurden durch Trypsinbehandlung in F_0 -arme und F-reiche fusionogene Viren übergeführt (HOMMA und TAMAGAWA, 1973; HOMMA und OHUCHI, 1973; SCHEID und CHOPPIN, 1974). SETO et al. (1974) konnten mit monospezifischem Antiserum gegen den F-Faktor von NDV die Fusion hemmen ohne die HA- und NA-Aktivität des größeren Glykoproteids zu beeinträchtigen. Sie zeigten aber auch, daß ein Antiserum gegen den Faktor HN sowohl die HA- und NA-Aktivität wie auch die Fusion hemmen. Es scheint also der zur Fusionsauslösung essentielle Faktor F erst in einer Kooperation mit dem zweiten Hüllen-Glykoproteid HN und mit (Teilen) der Lipidmembran seine Wirkung entfalten zu können.

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß die Induktion zur Riesenzellbildung offensichtlich vom Erreichen eines gewissen Schwellenwertes der Zahl der intakten fusionogenen Partikel abhängig ist. Wenn auch die Spezifität der Fusionshemmung durch 2-Desoxy-D-Glucose und D-Glucosamin unter den

beschriebenen Bedingungen nicht nachweisbar ist, so läßt sich doch die Reduktion der biologisch aktiven Partikel gut korrelieren mit der Fusionsverzögerung durch die beiden verwendeten Glucose-Derivate.

F. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die durch die Parainfluenza Viren SV5 und NDV induzierte Fusion von BHK21-F-Zellen kann durch die Glucosederivate 2-Desoxy-D-Glucose und D-Glucosamin gehemmt werden. Das optimale Molaritätsverhältnis der Hemmsubstanzen gegenüber der Medium-Glucose beträgt 1,6 : 1. Die Zuckerderivate müssen in beiden Virus-Zellsystemen bis zur 4. Stunde nach Infektionsbeginn dem Medium hinzugefügt werden, bei einer Beimengung zu einem späteren Zeitpunkt kommt es zu keiner Fusionshemmung.

2. Die Fusionshemmung ist bei 2-Desoxy-D-Glucose länger anhaltend als bei D-Glucosamin, aber bei beiden Substanzen nur vorübergehend. Die zeitliche Verzögerung des Auftretens der Fusion beträgt bei beiden Virus-Zellsystemen 70 bis 100%.

3. Die Latenzzeit wird bei der Virusproduktion nicht berührt, es kommt jedoch zu einer deutlichen Depression der Zuwachsrates von Plaque-bildenden Einheiten sowie zu einer Senkung der maximalen Virusproduktion bei SV5 von etwas mehr als einer Zehnerpotenz, bei NDV von deutlich weniger als einer Zehnerpotenz. Die Entwicklung des Hämagglutinationstiters korreliert hierzu.

4. Die Virusproteinbildung wird im BHK21-F-NDV-System mit Hilfe der Polyacrylamidgel-Elektrophorese zur 4. und 7. Stunde post infectionem untersucht. Es findet sich kein Hinweis, daß die zur Fusionshemmung eingesetzten Glucose-derivate ein Virusprotein, insbesondere das als Fusionsfaktor bezeichnete Glykoprotein F sowie dessen Vorläufer F_0 , in signifikanter Weise verändert. Die Hemmsubstanzen führen lediglich zu einer unspezifischen Verzögerung und Senkung der Virusproteinbildung. Diese Befunde stehen im Einklang mit denen der o.g. biologischen Tests.

G. LITERATURVERZEICHNIS

1. APOSTOLOV, K. und ALMEIDA, J.D. (1972).
Interaction of Sendai (HVJ) virus with human erythrocytes: a morphological study of haemolysis and cell fusion.
J. gen. Virol. 15, 227.
2. BABLANIAN, R., EGGERS, H.-J. und TAMM, I. (1965).
Studies on the mechanism of poliovirus-induced cell damage. I. The relation between poliovirus-induced metabolic and morphological alterations in cultured cells.
Virology 26, 100.
3. BAQUERO, M.M. (1972).
Einwirkung verschiedener Temperaturen und von Canavanin auf die Vermehrung eines Parainfluenzavirus (Newcastle disease Virus) in Kulturen primärer Hühnerfibroblasten.
Dissertation, Gießen.
4. BIELY, P. und BAUER, S. (1968).
The formation of guanosine diphosphate -2-deoxy-D-glucose in yeast.
Biochim. Biophys. Acta 156, 432.
5. BIELY, P., KRATKY, Z. und BAUER, S. (1972).
Metabolism of 2-deoxy-D-glucose by baker's yeast. IV. Incorporation of 2-deoxy-D-glucose into cell wall mannon.
Biochim. Biophys. Acta 255, 631.
6. BONIN, O. (1973).
Quantitativ-virologische Methodik.
Thieme Verlag (Stuttgart), p. 64.

7. BRATT, M.A. und GALLAHER, W.R. (1969).
Preliminary analysis of the requirements of fusion from within and fusion from without by Newcastle disease virus.
Proc. Nat. Acad. Sci. US 64, 536.
8. CALIGUIRI, L.A., KLENK, H.-D. und CHOPPIN, P.W. (1969).
The proteins of the parainfluenza virus SV5.
I. Separation of virion polypeptides by polyacrylamid gel elektrophoresis.
Virology 39, 460.
9. CHEN, C., COMPANS, R.W. und CHOPPIN, P.W. (1971).
Parainfluenza virus surface projections: Glycoproteins with hemagglutinin and neuraminidase activities.
J. Gen. Virol. 11, 53.
10. CHOPPIN, P.W. (1964).
Multiplication of a myxovirus (SV5) with minimal cytopathic effects and without interference.
Virology 23, 224.
11. CHOPPIN, P.W. und HOLMES, K.V. (1967).
Replication of SV5 RNA and the effect of superinfection with poliovirus.
Virology 33, 442.
12. CHOPPIN, P.W., KLENK, H.-D., COMPANS, R.W. und CALIGUIRI, L.A. (1971).
The parainfluenza virus SV5 and its relationship to the cell membrane.
Perspect. Virol. 7, 127.
13. COMPANS, R.W. (1973a).
Influenza virus proteins. II. Association with components of the cytoplasm.
Virology 51, 56.

14. COMPANS, R.W. (1973b).
Distinct carbohydrate components of influenza virus glycoproteins in smooth and rough cytoplasmic membranes.
Virology 55, 541.
15. COMPANS, R.W. und DIMMOCK, N.J. (1969).
An electron microscopic study of single-cycle infection of chick embryo fibroblasts by influenza virus.
Virology 39, 499.
16. COMPANS, R.W. und CHOPPIN, P.W. (1971).
The structure and assembly of influenza and para-influenza viruses. In: Comparative Virology. (Maramorosch, K. und Kurstak, F., eds).
Academic Press (New York) pp. 407-432.
17. COMPANS, R.W., HOLMES, K.V., DALES, S. und CHOPPIN, P.W. (1967).
An electron microscopic study of moderate and virulent virus-cell interactions of the parainfluenza virus SV5.
Virology 30, 411.
18. COMPANS, R.W., KLENK, H.-D., CALIGUIRI, L.A. und CHOPPIN, P.W. (1970).
Influenza virus proteins. I. Analysis of polypeptides of virion and identification of spike glycoproteins.
Virology 42, 880.
19. DAVENPORT, F.M., ROTT, R. und SCHÄFER, W. (1960).
Physical and biological properties of influenza virus components after ether treatment.
J. exp. Med. 112, 765.
20. DRZENIEK, R., SABER, M.S. und ROTT, R. (1966).
Veränderung der Erythrozyten-Oberfläche durch Newcastle disease Virus.
Z. Naturforsch. 21b, 254.

21. DULBECCO, R. und VOGT, M. (1954).
Plaque formation and isolation of pure lines with
poliomyelitis viruses.
J. exp. Med. 99, 167.
22. EAGLE, H. (1959).
Amino acid metabolism in mammalian cell cultures.
Science 130, 432.
23. EARLE, W.R. (1943).
Production of malignancy in vitro. IV. The mouse
fibroblast cultures and changes seen in the living
cells.
J. Nat. Cancer Inst. 4, 165.
24. GALLAHER, W.R., LEVITAN, D.B. und BLOUGH, H.A. (1973).
Effect of 2-deoxy-D-glucose on cell fusion
induced by Newcastle disease and herpes simplex
viruses.
Virology 55, 193.
25. GANDHI, S.S., STANLEY, P., TAYLOR, J.M. und WHITE, D.O.
(1972).
Inhibition of influenza virus glycoprotein synthesis
by sugars.
Microbios. 5, 41.
26. HALL, W.W. und MARTIN, S.J. (1974).
The biochemical and biological characteristics
of surface components of measles virus.
J. Gen. Virol. 22, 363.
27. HARRIS, H. und WATKINS, J.F. (1965).
Hybrid cells derived from mouse and man:
artificial heterokaryons of mammalian cells
from different species.
Nature (London) 205, 640.

28. HIGHTOWER, L.E. und BRATT, M.A. (1974).
Protein synthesis in Newcastle disease virus-
infected chicken embryo cells.
J. Virol. 13, 788.

29. HOLMES, K.V. (1968).
Cell fusion induced by parainfluenza virus SV5.
Dissertation, Rockefeller University, New York.

30. HOLMES, K.V. und CHOPPIN, P.W. (1966).
On the role of the response of the cell membrane
in determining virus virulence. Contrasting effects
of the parainfluenza virus SV5 in two cell types.
J. exp. Med. 124, 501.

31. HOMMA, M. und OHUCHI, M. (1973).
Trypsin action on the growth of Sendai virus in
tissue culture cells. III. Structural difference
of Sendai viruses grown in eggs and tissue culture
cells.
J. Virol. 12, 1457.

32. HOMMA, M. und TAMAGAWA, S. (1973).
Restoration of the fusion activity of L cell-borne
Sendai virus by trypsin.
J. Gen. Virol. 19, 423.

33. HOSAKA, Y. (1974).
Artificial assembly of active envelope particles
of HVJ (Sendai virus). In: Negative strand viruses.
(Barry, R.D. und Mahy, B.W.J., eds.).
Academic Press (London). Im Druck.

34. HOWE, C. und MORGAN, C. (1969).
Interactions between Sendai virus and human
erythrocytes.
J. Virol. 3, 70.

35. KALUZA, G., SCHOLTISSEK, C. und ROTT, R. (1972).
Inhibition of the multiplication of enveloped
RNA viruses by glucosamine and 2-deoxy-D-glucose.
J. Gen. Virol. 14, 251.

36. KALUZA, G., SCHMIDT, M.F.G. und SCHOLTISSEK, C.
(1973).
Effect of 2-deoxy-D-glucose on the multiplication
of Semliki Forest virus and the reversal of the
block by mannose.
Virology 54, 179.

37. KILBOURNE, E.D. (1959).
Inhibition of influenza virus multiplication with a
glucose anti-metabolite (2-deoxy-D-glucose).
Nature (London) 183, 271.

38. KLENK, H.-D. (1974).
Viral envelopes and their relation to cellular
membranes.
Current topics in Microbiology and Immunology.
Springer Verlag (Berlin, Heidelberg, New York).
Im Druck.

39. KLENK, H.-D. und CHOPPIN, P.W. (1969).
Chemical composition of the parainfluenza virus SV5.
Virology 37, 155.

40. KLENK, H.-D. und CHOPPIN, P.W. (1970).
Glycosphingolipids of plasma membranes of
cultured cells and an enveloped virus (SV5) grown
in these cells.
Proc. Nat. Acad. Sci. US 66, 57.

41. KLENK, H.-D. und ROTT, R. (1973).
Formation of influenza virus proteins.
J. Virol. 11, 823.

42. KLENK, H.-D., CALIGUIRI, L.A. und CHOPPIN, P.W. (1970).
The proteins of the parainfluenza virus SV5.
II. The carbohydrate content and glycoproteins of the virion.
Virology 42, 473.
43. KLENK, H.-D., SCHOLTISSEK, C. und ROTT, R. (1972).
Inhibition of glycoprotein biosynthesis of influenza virus by D-glucosamine and 2-deoxy-D-glucose.
Virology 49, 723.
44. KLENK, H.-D., WÖLLERT, W., ROTT, R. und SCHOLTISSEK, C. (1974a).
Association of influenza virus proteins with cytoplasmic fractions.
Virology 57, 28.
45. KLENK, H.-D., WÖLLERT, W., ROTT, R. und SCHOLTISSEK, C. (1974b).
Biosynthesis of the influenza virus hemagglutinin.
In: Negative strand viruses (Barry, R.D. und Mahy, B.W.J., eds.).
Academic Press (London). Im Druck.
46. KOHN, A. (1965).
Polykaryocytosis induced by Newcastle disease virus in monolayers of animal cells.
Virology 26, 228.
47. KRAUS, W. und SCHÄFER, W. (1963).
Apparatur zur Herstellung von primären Kulturen animaler Zellen.
Zbl. Vet. Med. 10, 394.
48. LÄMMLI, U.K. (1970).
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature (London) 227, 680.

49. LUDWIG, H., BECHT, H. und ROTT, R. (1974).
Inhibition of herpes virus induced cell fusion by concanavalin A, antisera and 2-deoxy-D-glucose.
J. Virol. Im Druck.
50. LUGENBÜHL, D. (1873).
Arbeiten aus dem Berner Pathologischen Institut.
(Würzburg). p. 159. Zitiert nach Poste, 1970.
51. MELNICK, J.L. (1973).
Classification and nomenclature of viruses, 1973.
Progr. med. Virol. 16, 337.
52. MOUNTCASTLE, W.E., COMPANS, R.W. und CHOPPIN, P.W. (1971).
Proteins and glycoproteins of paramyxoviruses:
A comparison of simian virus 5, Newcastle disease virus, and Sendai virus.
J. Virol. 7, 47.
53. MÜLLER, J. (1838).
Über den feineren Bau und die Formen der krankhaften Geschwülste.
(Berlin). Zitiert nach Poste, 1970.
54. PLAGEMANN, P.G.W. und ERBE, J. (1973).
Transport and metabolism of glucosamine by cultured Novikoff rat hepatoma cells and effects on nucleotide pools.
Cancer Res. 33, 482.
55. POSTE, G. (1970).
Virus-induced polykaryocytosis and the mechanism of cell fusion.
Advanc. Virus Res. 16, 303.

56. ROIZMAN, B. (1962).
Polykaryocytosis.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 27, 327.
57. ROKITANSKY, C. (1855).
Lehrbuch der pathologischen Anatomie.
Braumüller (Wien). Zitiert nach Poste, 1970.
58. SAMSON, A.C.R. und FOX, C.F. (1974).
Selective inhibition of Newcastle disease
virus-induced glycoprotein synthesis by D-glucosamine
hydrochloride.
J. Virol. 13, 775.
59. SCHÄFER, W. (1950).
Vergleichende Untersuchungen über das atypische und
klassische Geflügelpestvirus.
Tierärztl. Umschau 13/14, 241.
60. SCHEID, A. und CHOPPIN, P.W. (1973).
Isolation and purification of the envelope proteins
of Newcastle disease virus.
J. Virol. 11, 263.
61. SCHEID, A. und CHOPPIN, P.W. (1974).
Identification of biological activities of para-
myxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion,
hemolysis, and infectivity by proteolytic cleavage
of an inactive precursor protein of Sendai virus.
Virology 57, 475.
62. SCHEID, A., CALIGUIRI, L.A., COMPANS, R.W. und
CHOPPIN, P.W. (1972).
Isolation of paramyxovirus glycoproteins. Association
of both hemagglutinating and neuraminidase activities
with the larger SV5 glycoprotein.
Virology 50, 640.

63. SCHMIDT, M.F.G., SCHWARZ, R.T. und SCHOLTISSEK, C. (1974).
Nucleoside diphosphate derivatives of 2-deoxy-D-glucose in animal cells.
Eur. J. Biochem. Im Druck.
64. SCHOLTISSEK, C. (1971).
Detection of an unstable RNA in chick fibroblasts after reduction of the UTP-pool by glucosamine.
Eur. J. Biochem. 24, 358.
65. SCHOLTISSEK, C., DRZENIEK, R. und ROTT, R. (1969).
Myxoviruses. In: The Biochemistry of Viruses. (Levy, H.R. ed.).
Dekker (New York). p. 219.
66. SCHOLTISSEK, C., KALUZA, G., SCHMIDT, M. und ROTT, R. (1974).
Influence of sugar derivatives in glycoprotein synthesis of enveloped viruses. In: Negative strand viruses. (Barry, R.D. und Mahy, B.W.J. eds).
Academic Press (London). Im Druck.
67. SETO, J.T., BECHT, H. und ROTT, R. (1974).
Effect of specific antibodies on biological functions of the envelope components of Newcastle disease virus.
Virology, im Druck.
68. STANLEY, P., GANDHI, S.S. und WHITE, D.O. (1973).
The polypeptides of influenza virus. VII. Synthesis of the hemagglutinin.
Virology 53, 92.
69. WATKINS, J.F. (1971).
Cell fusion in virology.
Perspect. Virol. 7, 159.

70. WEIGERT, C. (1874).
Anatomische Beiträge zur Lehre von den Pocken.
(Breslau) p. 40. Zitiert n. Poste, 1970.
71. ZIMMERMANN, T. und SCHÄFER, W. (1960).
Effect of p-fluorophenylalanine on fowl plague
virus multiplication.
Virology 11, 676.

H. VERZEICHNIS VERWENDETER ABKÜRZUNGEN
(ohne physikalische Standard-Bezeichnungen)

Abb.	=	Abbildung
Abk.	=	Abkürzung
BHK	=	Babyhamster-Nieren
bzw.	=	beziehungsweise
ca.	=	circa
EDTA	=	Äthylendiamintetroessigsäure
et al.	=	und andere
etc.	=	und so weiter
evtl.	=	eventuell
F	=	Fusionsfaktor
F _O	=	Vorläufer von F
FKS	=	Fetales Kälberserum
GTP	=	Guanosintriphosphat
HA	=	Hämagglutinin
HA _O	=	Vorläufer von HA
HAE	=	Hämagglutinin-Einheit
HN	=	Hämagglutinin/Neuraminidase-Protein
M	=	Membranprotein
MG	=	Molekulargewicht
NA	=	Neuraminidase
NDV	=	Newcastle disease virus
NP	=	Nukleokapsid-Protein
o.g.	=	oben genannt
P	=	Polymerase-Komplex

p., p.p.	= Seite, Seiten
PAGE	= Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBE	= Plaque bildende Einheit
PBS	= Phosphat gepufferte Salzlösung
p.i.	= post infectionem = nach Infektion
REM	= reinforced Eagle's medium = verstärktes E.M.
RhMK	= Rhesusaffen-Nieren
RNA	= Ribonukleinsäure
SDS	= Natriumdoäcylsulfat
SFV	= Semliki Forest Virus
sog.	= sogenannt
s.S.	= siehe Seite
s.u.	= siehe unten
SV5	= Simian Virus 5
Tab.	= Tabelle
TEMED	= Tetraäthylmethyldiamin
TPB	= Tryptosephosphat Bouillon
UTP	= Uridintriphosphat
vgl.	= vergleiche
ZpM	= Zerfälle pro Minute

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. H.-D. Klenk für die stets gewährte wissenschaftliche und menschliche Unterstützung.

Ebenso danke ich allen Angehörigen des Virologischen Institutes für die allseits erwiesene Hilfe.

Diese Arbeit ist im Sonderforschungsbereich 47 "Virologie", Gießen, entstanden und wurde unter Verwendung der ihm von der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellten Mittel durchgeführt.

Lebenslauf

Am 30. Januar 1940 wurde ich als Sohn des Schriftstellers Kurt Bortfeldt und seiner Ehefrau Gerhild, geb. Mathies in Hamburg geboren.

Nach der Absolvierung des Abiturs im Sommer 1960 am humanistischen Maximiliansgymnasium in München folgte zunächst das Studium der evangelischen Theologie und Germanistik in Göttingen bis zum Wintersemester 1961/62. Dann studierte ich Humanmedizin in München, Wien und Hamburg. Nach dem Staatsexamen im Dezember 1967 in Hamburg erfuhr ich meine weitere Ausbildung als Medizinalassistent in der dortigen Universitäts-Hautklinik, im Jüdischen Krankenhaus sowie im Rudolf Virchow Krankenhaus in Westberlin.

Die Approbation als Arzt erfolgte im Januar 1970. Vom 1.1.1970 bis zum 30.9.1972 arbeitete ich als Assistenzarzt in der II. Medizinischen Klinik (Infektionsabteilung) des o.g. Rudolf Virchow Krankenhauses (Leitung: Priv.-Doz. Dr. H.D. Pohle). Im Sommer 1971 war ich zwischenzeitlich für 3 Monate Gast des Tropeninstitutes in Hamburg. Seit 1.1.1973 bin ich in der Diagnostischen Abteilung des Virologischen Institutes der Justus Liebig-Universität Gießen tätig.

